

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-524083

(P2002-524083A)

(43)公表日 平成14年8月6日(2002.8.6)

(51)Int.Cl⁵

識別記号

P I

テ-71-ト(参考)

C 12 N 15/09

C 12 P 21/02

C 4 B 0 2 4

5/10

(C 12 P 21/02

C 4 B 0 6 4

C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

4 B 0 6 5

// (C 12 P 21/02

C 12 N 15/09

A

C 12 R 1:91)

5/00

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21)出願番号

特願2000-569001(P2000-569001)

(86) (22)出願日 平成11年9月2日(1999.9.2)

(85)翻訳文提出日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(86)国際出願番号 PCT/EP99/06466

(87)国際公開番号 WO00/14261

(87)国際公開日 平成12年3月16日(2000.3.16)

(31)優先権主張番号 98116821.4

(32)優先日 平成10年9月4日(1998.9.4)

(33)優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71)出願人 サイトス・バイオテクノロジー・アクチエ
ンゲゼルシャフト

CYTOS BIOTECHNOLOGY
AG

スイス、ツェーハー-8952チューリッヒ-
シュリーレン、ヴァギシュトラーゼ21番

(72)発明者 ヴォルフガング・アンドレアス・レナー
スイス、ツェーハー-8006チューリッヒ、
ヴァインベルクシュトラーゼ64番

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトエリスロポエチンの生産

(57)【要約】

本発明は、脊髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより誘導されたヒトエリスロポエチン遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換した哺乳動物細胞中、特に脊髄細胞中における、組換え体ヒトエリスロポエチンの生産に関する。さらに本発明は、大腸菌由来のトリプトファンシンセターゼ遺伝子を選択可能マークーとして用いる、エリスロポエチン生産細胞の調製にも関する。本発明は、血清を含まず蛋白質も含まない培地を用いる細胞培養プロセスの改良にも向けられている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】宿主細胞を適切な栄養条件で培養する段階を含む、哺乳動物宿主細胞中におけるヒトエリスロポエチニンの生産方法であって、該宿主細胞が脊髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより制御されるヒトエリスロポエチニンをコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランسفェクトされており、該栄養条件が血清を含まず蛋白質も含まない培地であることを含むものである方法。

【請求項2】DNA配列がゲノミッククローンに由来するものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】宿主細胞が腎臓細胞である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】細胞がベビーハムスター腎臓細胞、好ましくはBHK21細胞である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】血清を含まず蛋白質も含まない培地がツルボドーマ(Turboforma)培地である、請求項1ないし請求項4の何れかに記載の方法。

【請求項6】宿主細胞がそのトリプトファン産生能力により選択される、請求項1ないし請求項5の何れかに記載の方法。

【請求項7】宿主細胞が大腸菌のトリプトファンシンセターゼ(trpB)遺伝子の発現によりトリプトファンを生産し得る、請求項6に記載の方法。

【請求項8】さらに、宿主細胞の培養後、細胞培養培地からエリスロポエチニンを回収する段階を含む、請求項1ないし請求項7の何れかに記載の方法。

【請求項9】脊髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより制御されるヒトエリスロポエチニンをコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランسفェクトされ、血清を含まず蛋白質も含まない培地中で培養された哺乳動物宿主細胞。

【請求項10】大腸菌のトリプトファンシンセターゼ(trpB)遺伝子の発現によりトリプトファンを生産し得る、請求項9に記載の哺乳動物宿主細胞。

【請求項11】細胞が腎臓細胞、好ましくはベビーハムスター腎臓細胞、最も好ましくはBHK21細胞である、請求項9または請求項10に記載の哺乳

(3)

特表2002-524083

動物宿主細胞。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、脊髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより誘導されたヒトエリスロポエチン遺伝子を含有する発現ベクターにより形質転換された哺乳動物細胞、特に腎臓細胞中における、組換え体ヒトエリスロポエチンの生産に関する。さらに本発明は、選択可能マーカーとして大腸菌(*Escherichia coli*)由来のトリプトファンシンセターゼ遺伝子を用いるエリスロポエチン生産細胞の調製に関する。本発明はさらに、血清を含まない蛋白質も含まない培地を用いる細胞培養プロセスの改良にも向けられている。

【0002】**(発明の背景)**

エリスロポエチンは、循環しているエリスロポエチンマスの生理学的レベルを調節し維持する主要なホルモンであり、赤血球生成の早い段階で骨髄幹細胞の細胞分化を刺激し、最終的に赤血球になる分化細胞の増殖と成熟（減数分裂、maturation）を促進する。エリスロポエチンは、34ないし38 kDaの範囲の分子量を有し、その40ないし50%が炭化水素部分とみられる糖蛋白質である。それは原始的には成人の腎臓内、および哺乳動物胎児の肝臓内に产生する。身体が健常状態にあり、組織が赤血球の現存数により充分に酸素供給を受けているときは、エリスロポエチンは血漿内に極めて低い濃度で存在している。この通常の低濃度は、通常の加齢によって失われてゆく赤血球の置換を刺激するには充分である。低酸素血症では循環する赤血球により輸送される酸素が減少し、循環系内のエリスロポエチン量が増加する。低酸素血症は、脳出血、放射線への過度の曝露による赤血球の破壊、高い高度あるいは人事不省による酸素取り込みの減少、または各種型の貧血により、血液の大量が失われて生じる。健康な器官中ではホメオスタシス（定常化傾向）機構が、貧血の程度に応じて最適ヘマトクリット値を維持するように血中のエリスロポエチン濃度の増加を誘導する。

【0003】

しかしながら、慢性腎不全による貧血の場合は、進行性の腎実質および肝機能

破壊のためエリスロポエチンが産生され得ず、従って、循環系中のエリスロポエチン濃度が増加しない。

エリスロポエチンは今や各種貧血症、特に慢性腎不全症の認容された処置として定着するに至っている。エリスロポエチンを含有する医薬製品は、さらに赤血球生成刺激による、腎機能低下のためあるいは腎摘出後のために血液透析を受けている患者の貧血予防および術後患者の回復促進などでも、臨床的に適用されている。

【0004】

組換え体ヒトエリスロポエチンは、哺乳動物細胞中で産生された最初の組換えバイオ医薬品として貧血症の処置のために入手可能となったものである。例えば、ドイツではCHO-K1セルライン中で産生された組換え体エリスロポエチンがJanssen-CilagからErypoの商品名（登録商標）で販売されている。

【0005】

ヒトエリスロポエチン遺伝子は、既に1985年に単離され、特性を調べられている(Lin et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7580-7584; Jacobs et al. (1985) Nature 313, 806-810)。この遺伝子の全コード化領域は5.4キロ塩基HindIII-BamHI断片内に含まれており、この遺伝子は4つのインtron(1562塩基対)と5つのエクソン(582塩基対)とを含み、ヒトエリスロポエチン分泌のための27アミノ酸シグナルペプチド、および166アミノ酸の成熟蛋白質をコードしている。さらに、エリスロポエチンは、インビボでの活性に必要なシアル酸を含有している。非グリコシル化（糖鎖付加のない）エリスロポエチンはインビトロの活性は有するが、インビボでは全く活性を示さない。これは、非グリコシル化（糖鎖付加のない）蛋白質の半減期がヒトの循環系では極端に短いことによる。

【0006】

Lin et al. (前記)は、SV40下流プロモーターにより誘導されたゲノミックエリスロポエチン遺伝子を含有する発現ベクターで安定的に形質転換した、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞中での組換え体ヒトエリスロポエチン産生を記載しており、他方、Jacobs et al.は、アデノウイルスの主要下流プロモー

ターの制御下にヒトエリスロポエチンcDNAを含有するベクターでトランスフェクトした、COS細胞（猿細胞由来のSV40DNAの完全長分節を含有するセルライン）中の一時的発現実験でのエリスロポエチン産生を開示している。

【0007】

さらに、欧州特許出願No.0148605には、猿エリスロポエチンcDNAクローンおよびヒトゲノミッククローンの単離および性質特定、および、COS-1およびCHOセルライン中での組換え体エリスロポエチンの産生が記載されている（但し、猿およびヒトのエリスロポエチン遺伝子発現はSV40下流プロモーターの制御下で行う）。

【0008】

欧州特許出願No.0225231には、エリスロポエチン遺伝子をアデノウイルス-2主要下流プロモーター、またはマウスのMT-I (metallothionein-I) プロモーターのいずれかの制御下に発現させる、安定的にトランスフェクトした哺乳動物のセルライン中でのエリスロポエチン産生プロセスが記載されている。

【0009】

さらに、欧州特許出願No.0232034には、ヒト細胞中での、即ち、ナマルワ (Nama Iwasa) 細胞中での、SV40プロモーターを用いてエリスロポエチンの発現を誘導し、ネオマイシン耐性(neo')遺伝子を選択可能なマーカーとして用いる、組換え体エリスロポエチンの産生が記載されている。

【0010】

同様に、欧州特許出願No.0236059には、M-MuLV (Moloney murine leukemia virus)LTRプロモーターの制御下で、neo'遺伝子を選択可能なマーカーとする、ヒトエリスロポエチン遺伝子を保持する発現ベクターでトランスフェクトした、腎臓細胞中でのエリスロポエチンの産生が開示されている。

しかしながら、大規模なエリスロポエチンの生産に適する効果的な発現システムがなお必要とされていた。

【0011】

(発明の開示)

本発明の目的の一つは、従って、哺乳動物細胞中で高レベルにエリスロポエチ

ンを発現させるエリスロポエチン発現ベクターを提供すること、および、該発現ベクターをベースとする組換え体エリスロポエチンの生産プロセスを提供することである。

【0012】

驚くべきことに、MPSV(脊髄増殖性肉腫ウイルス、*myeloproliferative sarcoma virus*)プロモーターおよびゲノミックエリスロポエチンDNA配列をベースとする新しい宿主ベクター系を用いると、哺乳動物細胞におけるエリスロポエチン生成物を、細胞培養液上澄み中の全蛋白質の50%以上にも及ぶ大画分となし得ることが判明した。

【0013】

本発明は、従って、MPSV (*myeloproliferative sarcoma virus*)プロモーターにヒトエリスロポエチン遺伝子を作動可能なように連結させてある新規発現ベクターを提供するものである。さらに、該新規発現ベクターをトランスフェクトした哺乳動物宿主細胞を適切な栄養条件下に培養する段階を含む、哺乳動物宿主細胞中にエリスロポエチンを生産させるプロセスを提供するものである。

【0014】

脊髄増殖性肉腫ウイルスは、以前、Ostertage et al. (1980) J. Virol. 33, 573-582; よって報告され：ネズミの線維芽細胞 (*murine fibroblasts*) を形質転換し、さらに血液生成系の細胞中に変化を起こさせるものとして知られている。この本発明で用いるMPSVプロモーターは、既に、例え、Artelt et al. (1988) Gene 68, 213-219によって研究されている。

【0015】

好ましい態様では、哺乳動物宿主細胞中でエリスロポエチンを生産させるこのプロセスは、(1) エリスロポエチンの発現がMPSVプロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターの調製、(2) 該エリスロポエチン発現ベクターの哺乳動物宿主細胞中への導入、(3) 該細胞の培養によるエリスロポエチンの生産、および(4) 該細胞培地からのエリスロポエチンの回収、の各段階を含むものである。

好ましくは、哺乳動物宿主細胞は腎臓細胞であり、最も好ましくは、ベビーハ

ムスターの腎臓（BHK）細胞、例えば、BHK 21である。

【0016】

先行技術の多くは、DHF R 遺伝子によりコードされる酵素ジヒドロフォレートリダクターゼ (dihydrofolate reductase; DHFR) が、メトトレキセート (methotrexate) 薬剤によって阻害され得るという事実およびヒポキサンチンおよびチミジンを欠く培地で増殖した細胞がメトトレキセートによって阻害または殺滅されるという事実に依拠する、DHFR 選択系を使用している。適当な条件下、例えばメトトレキセートの最小濃度においては、メトトレキセート含有培地中で耐性があり生育し得る細胞を取得することができる。これらの細胞は、それらのDHFR 遺伝子数が増幅すること、そのためDHFR 酵素産生の増加を来すことからメトトレキセート耐性であることが分る。

【0017】

これらの生存細胞は、順次メトトレキセートの濃度増加処理を受けてより多くのDHFR 遺伝子数を含有する細胞株となり得る。興味の対象である、DHFR 遺伝子と一緒にまたはDHFR 遺伝子で形質転換されて発現ベクター上に組み込まれたこの遺伝子、例えば、エリスロポエチン遺伝子は、しばしばそれらの遺伝子コピー数を増加して見出される。従って、このDHFR 系は概して選択／増幅の組合せアプローチで用いられる。しかしながら、このDHFR 選択／増幅系の使用には、それに伴う若干の問題点がある。メトトレキセートの強い毒性のために、全生産プロセスを通して選択圧を維持することができない。高度生産も、培地からメトトレキセートを一旦除去すると、普通の生産性に戻ってしまうことが多い。

【0018】

さらに、先行技術でよく用いられている別の抗代謝物耐性マーカー、neoマーカーには、哺乳動物細胞中で形質転換体を選択するのに高価な薬剤であるG 4 18を比較的に大量使用しなければならないという本質的な不都合がある。

従って、本発明の他の目的は、エリスロポエチン生産についての先行技術中で記載されている選択マーカーシステムの不都合を克服し、かつ有毒添加物を用いず、哺乳動物細胞中でエリスロポエチンを大量生産させるプロセスを提供する

ことにある。

【0019】

本発明によれば、トリプトファン生成能力に基づいて選択される哺乳動物宿主細胞中でエリスロポエチンを生産させるプロセスが提供される。

【0020】

多くの哺乳動物細胞は、ある種の、所謂必須アミノ酸合成に必要な酵素性経路を欠落しており、そのためそれらを外部ソースから得なければならない。必須アミノ酸1種の不存在だけでも蛋白質合成のほぼ50%が阻害される：基礎的な速度は明かに外因性蛋白質の移動によって遅延する。1988年、Hartman and Mulligan (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051)は、形質転換した哺乳動物細胞の代謝性選択用マーカーとしてトリプトファンを適用できることを発見した。このマーカーシステムは、大腸菌のトリプトファン合成遺伝子(*trpB*)をベースとするものであり、インドールのトリプトファンへの変換を触媒する。しかしながら、これまでのところ、*trpB*遺伝子がエリスロポエチン生産に有用な選択マーカーとして記載されたことは全くない。

【0021】

驚くべきことに、*trpB*を選択マーカーとして使用することにより、選択した宿主細胞中で、遺伝子増幅なしに高いエリスロポエチンの発現レベルを観測できることが判明した。

【0022】

好ましい態様では、トリプトファンシンセターゼ遺伝子を、エリスロポエチン発現ベクターにより、宿主細胞にコトランスフェクトする。しかしながら、適切なプロモーター、好ましくはMPSVプロモーターの制御下のヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列と、やはり適切なプロモーターの制御下の*trpB*遺伝子とを含有する単一核酸分子で、哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトすることも勿論可能である。

【0023】

細胞培養培地に普通加えられている血清、例えば、牛胎児血清が、トリプトファンバックグラウンドを示すという事実があるため、血清は透析してトリプトフ

アンを除去しておくべきである。それ故、この $trpB$ 選択システムは、トリプトファンを無毒かつ安価なインドールにより容易に置き換える得る、血清を含まない培地中での大規模生産に特に有用である。

それ故、好ましい態様では、このエリスロポエチン大量生産プロセスは、外因性トリプトファンを欠く血清を含まない培地中で、哺乳動物宿主細胞を培養する段階を含む。好ましくは、この宿主細胞は腎臓細胞、好ましくはBHK細胞、例えば、BHK21である。

【0024】

上で言及したように、現今の生産プロセスは、例えば牛胎児血清を含有する培地中で生育する組換え体チャニーズハムスター卵巣細胞のような組換え体哺乳動物細胞のローラーボトル培養をベースとするものである。血清の添加は、細胞増殖のために必要な生育因子を供給するために必須である。この添加物の存在は、しかしながら、幾つかの観点から有害なものであり；主たる懸念は生成物の安全性である。製造プロセスから医薬製品を経由して患者に病原性因子を移送する危険については、特に狂牛病（BSE；bovine spongiform encephalopathy）が広範囲に蔓延したとき以来、格別の考慮が払われている。下流の工程の間に不活性化されないブリオン（prions）は、ウイルスと同様に、プロセスに際して重大な危険を与える。この心配があるために、この危険を最小化するために必要な安全性の基準は、原材料（血清）についてのおびただしい試験から最終製品の性状検査に至るまで、すさまじいものとなっている。

【0025】

製造プロセスにおいて全ての生物学的誘導材料を排除することが製品の品質および安全性を顕著に増加させるばかりでなく、同時に製造コストを低減し製品の承認も簡易化するので、血清を含まず蛋白質も含まない培地を使用することは、組換え体哺乳動物細胞の培養に少なからぬ利点を与えるものである。

【0026】

例えば、EP-A-0148605は、0.1mM非必須アミノ酸およびL-グルタミンを補った高グルコースDMEM、または、0.05mM非必須アミノ酸およびL-グルタミンを補った、高グルコースDMEMとHam'sF12との50-50混合物である、血清を含ま

ない生育培地中でのCHO細胞からのエリスロポエチンの製法を開示している。

さらに、欧州特許出願No.0513738には、動物インシュリンの代わりに原核細胞由来の組換え体インシュリンおよびトランスフェリン、並びに水溶性鉄化合物を含有する、血清を含まない培地中での哺乳動物細胞の培養が記載されている。

【0027】

EP-A-0531911は、ポリビニルフルマルおよびポリビニルブチラル由来の培地表面を使用し、細胞が好ましくは連続単層として培養された、蛋白質を含まない培地中でのヴエロ細胞(vero cell)の培養プロセスを記載している。

しかしながら、多くの場合、血清を含まない培地中での培養は、その前に特別の適合ストラテジーにより血清を含まない培地中での生育に適合させたセルライン、例えば、Zang et al. (1995) により Bio/Technology 13, 389-392に記載されている適合させたCHO SSF3セルライン、または Sinacore et al. (1996) により Biotechnology and Bioengineering 52, 518-528に記載されているCHO-DUKX細胞系譜(cell lineage)、との関係においてのみ言及されている。

【0028】

BHK21細胞が、適合化または遺伝子操作しなくとも、血清を含まず蛋白質も含まない培地製剤である Turbodoma および Turbodoma HP-L (Dr. F. Messi Cell Culture Technologies Buhnrain社、14, 8052 Zurich, Switzerland製品) 中で生育することが見出された。この細胞は、10%の胎仔牛血清と2mMのL-グルタミンをTurbodoma 培地中に含有する Eagle's 最小必須培地から取出したのちも、有意な生育力および生育速度の下降を伴わずに細胞増殖を継続した。しかも、この培地製剤で、BHK21細胞の培養は、懸濁液中でも担体に結合させてもいずれの場合も可能であった。従って、反応系およびプロセスパラメーターを多様に選択適用できる。

【0029】

本発明の好ましい態様では、本発明の血清を含まず蛋白質も含まない培地中で培養した、好ましくはBHK21セルラインである哺乳動物セルラインは、ヒトエリスロポエチンを生産する能力を有する。最も好ましくは、この血清を含まず

蛋白質も含まない培地は、インシュリンを含有するが、しかし、トリプトファンは含有しないものとし、そのためトリプトファンシンセターゼ活性によりトリプトファンを産生し得るような細胞のみが生育し得るようにする。このトリプトファンシンセターゼ酵素活性は、細胞を、大腸菌由来の $trpB$ 遺伝子を保有する核酸分子でトランスフェクトすることにより具備するに至る。この $trpB$ 遺伝子は、任意のプロモーター、即ち、哺乳動物細胞中での転写をプロモートするプロモーター、例えば、ウイルス性プロモーター類例えばシミアンウイルス(simian virus)40 (SV40) の上流プロモーター、HIVおよびMPSVのプロモーター、などの制御下に置くことができる。

【0030】

それ故、好ましい態様では、本発明は、ヒトエリスロポエチンの生産プロセスであり、(1) エリスロポエチンの発現がMPSVプロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターの調製、(2) 該エリスロポエチン発現ベクターのBHK21細胞中への導入、(3) インドールは含有するがしかし外因性のトリプトファンは欠落している、蛋白質を含まず血清も含まない培地中での該細胞の培養、の各段階を含むものである。

【0031】

エリスロポエチンの発現がMPSVプロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターを使用し、この発現ベクターで形質転換した真核宿主細胞を、蛋白質を含まず血清も含まない培地中で培養することにより、EPO発現レベルが、先行技術に記載されているプロモーター／エリスロポエチン融合構成物を用する場合より際立って高くなることを見出した。同じことが、通常の培地との対比において、あるいは先行技術に記載されているような予め血清を含まない培地中で生育するように適合化させたセルラインとの対比において、蛋白質を含まず血清も含まない培地中で、MPSV／エリスロポエチン融合構成物で形質転換した真核細胞中にエリスロポエチンを産生させる場合にも当てはまる。

【0032】

本明細書中では、「エリスロポエチン」の用語は、エリスロポエチンの生物学的活性を有する；即ち、赤血球生成を刺激する能力がある、蛋白質を定義してい

ることを意味する。この蛋白質は、ゲノミックDNA配列により、またはcDNAクローンによりコードされ得る。さらに、「エリスロポエチン」の用語は、天然に存在するエリスロポエチンの生物学的活性を有する蛋白質断片をも含んでいい。好ましくは、組換え体蛋白質は、アミノ酸配列および数（成熟蛋白質では166アミノ酸）、その約40%ないし50%が炭水化物部分に基づく約34ないし38kDaの分子量について、完全にまたは少なくとも実質的に、天然に存在するヒトエリスロポエチンと対応している。

【0033】

ヒトエリスロポエチンに対する遺伝子は、例えば、American Type Culture Collectionから、ATCC No.40381のLambda HE 1 phage lyophilisateとして入手可能である。

【0034】

さらに、「プロモーター」の用語は、核酸分子中で遺伝子（ゲノミックまたはcDNAクローン）に先行し、mRNAへの遺伝子の転写開始部位を提供しているDNA配列を定義していることを意味する。従って、「発現ベクター」の用語は、その中で、発現させようとしている遺伝子にプロモーターが作動可能なように連結しており、該ベクターを宿主細胞内に導入したのち、宿主細胞を該遺伝子によりコードされている蛋白質を産生し得るようにする、核酸分子を定義している。しかしながら、作動可能なようにプロモーター（特にMPSVプロモーター）に融合している有用な遺伝子（特にエリスロポエチン遺伝子）に加えて、発現ベクターはさらなるプロモーター配列または他の調節配列、例えば、エンハンサー配列例えばSV40、アデノウイルス、レトロウイルスのLTR、またはイムノグロブリン遺伝子、ポリアデニル化配列、または選択可能なマーカー配列を含有していてもよい。適切な発現ベクターは、例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkによる標準マニュアルに記載されているような通常のクローニング技術を用いて取得できる。

【0035】

用語「宿主」は、非相同的（異種起源の、heterologous）核酸分子で安定的に

形質転換される、従って、そのゲノム中に該核酸分子または少なくともその部分を含有し、そして該核酸分子は該細胞により発現される、即ち転写または翻訳される遺伝子を保有しており、そして所望により遺伝子生成物が該細胞によって分泌される、細胞を含む。

【0036】

組換え体セルラインを確立するためには、種々の形質転換技法を採用できる。好ましくは、これらの細胞は、リン酸カルシウム法でトランスフェクトする（実施例2に記載）。しかしながら、他の通常のトランスフェクション法、例えば、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション技術、リゾチーム融合、プロトプラスト融合または赤血球融合、スクラッピング、直接取り込み、浸透性または蔗糖ショック、直接マイクロ注射、間接マイクロ注射例えば赤血球媒介技術、または宿主細胞への電流付加も使用できる。

【0037】

一般に、トランスフェクションまたは形質転換による、とは、単離したDNA、RNA、または組換え体DNA技術による合成スクレオチドポリマーを用いる、遺伝情報、殊にcDNAまたはゲノミックエリスロポエチンクローンによりコードされる情報の細胞中への移送を意味する。遺伝情報、特にヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列情報の細胞中への移送は、選択可能マーカー、好ましくは大腸菌由来の選択可能マーカーであるトリプトファンシンセターゼ遺伝子を用いる細胞のコトランスフェクションにより確実とすることができる。

【0038】

哺乳動物細胞の培養には、通常の培養方法、例えば、通常の組織培養に使用されるフラスコまたは皿を用いる懸濁培養、紡錘型容器中で培地を攪拌して懸濁液中で細胞を生育させる方法、その中に培地を連続的に循環させる中空の纖維内で細胞を生育させる方法、および動物細胞の培養用のジャーファーメンター中で細胞を生育させる方法、などを適用できる。

【0039】

哺乳動物細胞の培養後、組換え体発現生成物を、培地から通常の精製技術、例えば、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水

性相互作用クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー(hydroxyapatite)、ゲル濾過法、染料クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィー、を用いて実質的に精製形態で回収できる。

最終的に、回収したエリスロポエチンの生物学的活性は、数種の異なる方法により測定できる。Kurtz and Eckardt は、Nephron (1989);51 Suppl 1:11-14 中で最近のアッセイを総説している。

【0040】

(図面の簡単な説明)

図1は、8つの選択したBHK21 pMPSVgEPO、および8つの選択したCHO K1 : CycE pMPSVgEPOクローンの上澄みからのWestern Blotを示す。

図2は、BHK21 pMPSVgEPOクローン2由來の細胞培養液上澄みの銀染色SDSポリアクリルアミドゲルを示す。レーン1は濃縮していない上澄み液を示し、他方、レーン2は10倍濃縮上澄み液を示す。

図3は、Coomassie 染色SDS PAGEで分析した精製組換え体エリスロポエチンサンプルを示す。

【0041】

本発明は、以下さらに詳しく例示的に説明する。

(実施例)

実施例1

エリスロポエチン発現ベクター pMPSVgEPOの調製

【0042】

American Type Culture Collectionから、ヒトエリスロポエチン遺伝子を、凍結乾燥ラムダHE 1ファージ (Lin et al., 前記ATCC No.40381) として入手した。ヒトエリスロポエチンのためのゲノミックDNAを含有する断片を保有するラムダファージを充分量、この凍結乾燥ファージをSM緩衝液 (Sambrook et al., 前記) 中に懸濁させ、そして該ファージを、0.3%グルコース、0.075mMCaCl₂、0.004mMFeCl₃、2mMgSO₄ および1mg/mlマルトースを含有するLB寒天中でLE392大腸菌細胞上にプレートすることにより調製した。この

ファージ粒子を、15cmペトリ皿当たり10mのSMで一夜集める。このライセート(lysate)50mlのファージDNAを、Qiagen Lambda キットを用い、製造業者(Qiagen, Hilden, Germany)の指示どおりにして精製した。得られたDNAの50%を20 μ lH₂O中に取り込み、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびBamHI (New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Germany)各30ユニットで消化した。5.4 kb 断片を 0.8% アガロースゲルから、Bio 101 (Vista CA, USA)のGene Cleanキットを用いて溶出させた。この5.4 kb 断片は、4つの介在配列と5つのエクソンとを含む、ヒトエリスロポエチン遺伝子の完全コードを含有していた (Lin et al., 前記参照)。

【0043】

MPSVプロモーターを保有するベクター pMPSVHE (Artelt et al., 前記)は、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびBamHIにより、製造業者(NEB)の指示どおりにして消化し、リニヤー化したベクターDNAを、Gene CleanキットBio 101を用いてゲル精製した。ベクターDNAほぼ0.5 μ gと精製エリスロポエチン挿入遺伝子2 μ gを、T4 DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲートし、生成物をRbCl₂コンピテントDH5アルファ大腸菌細胞 (Sambrook et al., 前記) 中に形質転換した。制限分析による正確挿入を用いてコロニーを同定し、Qiagen Midiprep キットによりプラスミッドDNAを大量調製したのち、該ベクターを緩衝液2(NEB)の存在下に制限酵素HindIIIおよびBstEII(NEB)で消化して、エリスロポエチン遺伝子挿入の5'末端から575bp断片を除去した(エリスロポエチン遺伝子挿入の制限マップについては前記Lin et al., を再参照)。粘着末端を、全4ヌクレオチドの存在下に37℃で30分間、T7 DNAポリメラーゼ(NEB)で充填した。この充填反応生成物を、16℃で30分間、T4 DNAリガーゼ(NEB)の存在下にライゲートし、次いでRbCl₂コンピテントDH5アルファ大腸菌細胞中に形質転換後、正しいベクター構成を有する大腸菌クローニングを同定し、製造業者の指示どおりにQiagen Midiprep キットを用い、大量の当該ベクターDNAを調製した。生成したベクターは、MPSVプロモーターの制御下のゲノミックエリスロポエチン遺伝子を保有している、消化pMPSVgEPOであつた。

【0044】

実施例2

pMPSVgEPOベクターによる、BHK21およびCHO-K1:cycE細胞の安定なトランスフェクション

大腸菌のトリプトファンシンセターゼ遺伝子(*trpB*)を、安定なpMPSVgEPOベクターの選択に使用した。この系では、トランスクレクトした細胞を、トリプトファンシンセターゼ遺伝子(*trpB*)の遺伝子生成物の酵素活性による、インドールを必須アミノ酸トリプトファンに変換する能力で選択する。

【0045】

CaPO₄トランスクレクトの前に、発現ベクターを制限酵素AatIIによりリニヤー化し、*trpB*選択プラスミドpSV2trpB(前記Hartman and Mulliganに記載)を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIでリニヤー化した。5.7μgのpMPSVgEPOと0.3μgのpSV2trpBとの混合物を、30μlのH₂O中に調製した。30μlの1M CaCl₂溶液を混合物に加えた。60μlのリン酸塩溶液(50mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.05, 減菌濾過済み、オートクレーブ処理せず)を加えて5秒間旋回した。室温で25秒間インキュベートした後、沈殿を胎児牛血清(FCS)2%を含むTurbodoma培地2mlを含むポリプロピレンのチューブに移した。

【0046】

6ウエルプレートに入れた、BHK21およびCHO-K1:cycE細胞培養合流培地(Renner et al. Biotech. Bioeng. 47, 476-482, 1995)の80%を除去し、細胞を一度血清を含まないTurbodoma培地で洗った。沈殿に培地2mlを加えた後、細胞培養物を、37℃、5%CO₂で5時間インキュベートした。沈殿を除去し、グリセロール(Sigma)15%およびFCS2%を含有するTurbodoma培地を加えた。30秒後、グリセロールを含む培地を除去し、FCS10%を含有する培地5mlを加え、さらにプレートを数回ゆすった。培地を血清を含まない新鮮な培地3mlと置き換え、18時間後、細胞を、トリプトファンの代わりに300μMのインドールと5%の透析した胎児牛血清(Life Technologie)を含有する50mlの選択培地を満たしたペトリ皿中に移した。最初のクローンは、10日間培養した後視認で

きるようになるので、培地を80%アガロースで積層してから摘み上げた。1.6%アガロース溶液をMgおよびCaを含まないP B S中に調製し、オートクレーブし、そして42℃まで冷ました。この溶液を1：1比で予め加温した培地(42℃)と混合し、この溶液30 mlでプレートを積層した。室温でゲル化させたのち、コロニーをピベットで摘み上げた。残りの細胞培養プラスチックに粘着した細胞をトリプシンで脱着した。

【0047】

最初のクローンを、24ウエルプレート内の次いでT 25フラスコ内の、血清を含まないTurbodoma培地で生育させた。8つの選択したB HK 2 1およびCHO K 1:cyCE細胞クローンの生産性を、Western Blot分析で測定した。Western Blot分析では、全B HK 2 1細胞クローン中での生産性は、CHO K 1:cyCE細胞の場合より少なくとも10倍高かった(図1参照)。

最良結果を生成した2種(クローン2および10)を、異なった細胞培養系中懸濁およびマイクロキャリヤー内で試験した。実施例3および4に詳述する。

【0048】

実施例3

懸濁培養での組換え体ヒトエリスロポエチンの生産

B HK 2 1-pMPSVgEPO、クローン2を、スピナーフラスコ(Integra Bioscience)内の血清を含まず蛋白質も含まないTurbodoma培地懸濁液中で生育させた。T-フラスコ内で生育した2000万個の細胞を細胞解離溶液(Sigma)で脱着し、さらにスピナーフラスコ内で0.5g/l Puluronic F68(Sigma)を補ったTurbodoma培地200ml中に接種した。培養条件は、37℃、5%CO₂、回転数20 rpmであった。100,000細胞/mlの密度から出発し、細胞を4日間でほぼ100万細胞/mlの密度になるまで生育させた。7日後、細胞培養物を集め、培養液を3分間250gで遠心分離した。上澄みをSDS-PAGEで分析し、分子量約34-38kD(図2)のところに強い帯を検出した。Western Blot分析により、この帯が抗エリスロポエチン抗体(Research Diagnostics, USA)と交叉反応性であることを確認した。図2で観察できるように、生成物は上澄み中の総蛋白質の約50%を占めている。

【0049】

実施例4

マイクロキャリヤー培養での組換えヒトエリスロポエチンの生産

BHK21-pMPSVgEPO、クローン2を、スピナーフラスコ(Integra Bioscience)内の、血清を含まず蛋白質も含まないTurbodoma HP-1培地(F. M. Essi Cell Culture Technologies)中でマイクロキャリヤーに付着させて生育させた。T-フラスコ内で生育した2000万個の細胞を細胞解離溶液(Sigma)で脱着し、さらにTurbodoma HP-1培地25ml中で、5%CO₂の存在下、37°Cで5時間の間に、0.6gのCytodex 1マイクロキャリヤー(Pharmacia)に接種した。このマイクロキャリヤーは、製造業者の指示どおりに調製した。0.5g/1Puluronic F68(Sigma)を補ったTurbodoma HP-1培地200mlを入れたスピナーフラスコ内に、培養物を移した。培養条件を、37°C、5%CO₂、回転数20 rpmとした。100,000細胞/mlの密度から出発し、4日間で細胞が集合体となるまで生育させた。4日後、マイクロキャリヤーを沈殿させ、培地の70%を新鮮培地で置き換えた。5日後および6日後、それぞれ、培地の40%を新鮮培地で置き換え、7日後細胞培養物を集めた。上澄みは、ELISA(EPO ELISA, Boehringer Mannheim)で測定すると、10mg/l濃度の組換えヒトエリスロポエチンを含有していた。この組換えエリスロポエチン生成物を、実施例5に記載したようにして精製した。

【0050】

実施例5

組換えヒトエリスロポエチンの精製

この実施例は、細胞培養物上澄み液からの組換えヒトEPOの精製に関する。このプロセスは、Laemmli, U.K.に従うSDS-PAGEで分析し、Coomassieまたは銀染色したとき、約34,000MWにおけるポリペプチド成分中に現れる下記各段階を含む。：

- A. 青色セファロース上の染料クロマトグラフィー、
- B. ブチル-東洋パール上の疎水性相互作用クロマトグラフィー、
- C. ヒドロキシルアバタイト上のクロマトグラフィー、
- D. リソースQ上のアニオン交換クロマトグラフィー。

【0051】

A. 染料クロマトグラフィー

細胞を含まない培養物上澄みのpHを、酢酸でpH5.0に調節し、4℃ないし10℃で0.45μmフィルターを通してロ過した。ロ液、この実施例では200ml、を、予めpH 5.0, 4ml/min, 10℃で、20mMの酢酸ナトリウム、5mMのCaCl₂および100mMのNaClとで平衡化した、5mlの青色セファロースCL-6B(Pharmacia)カラム上に適用した。このゲルを、pH 5.0において20mMの酢酸ナトリウム、5mMのCaCl₂および100mMのNaClの5CVで、pH6.5において20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂の5CVで洗った。蛋白質は、pH 9.0で、100mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、および1MのNaClの2CVで溶出した。

【0052】

B. 縫水性相互作用クロマトグラフィー

青色セファロースカラムからの溶出液を、クロマトグラフィーの直後に1N HClでpH 6.9とし、負荷する前に10%イソプロパノールとした。5mlカラムにブチル-東洋パール(TosoHaas)を室温で負荷し、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、10%のイソプロパノールで平衡化した。蛋白質試料を負荷させたのち、カラムを、pH 6.9において、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、19%のイソプロパノールで洗った。EPO含量が優勢な蛋白質を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、27%のイソプロパノールで溶出させた。この画分を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂により、3分の1希釈した。

【0053】

C. ヒドロキシルアバタイト上のクロマトグラフィー

カラム5mlにヒドロキシルアバタイトUltraGelを室温で負荷し、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、250mMのNaCl、9%のイソプロパノールで平衡化した。前段階からの希釈溶出液を負荷後、カラムをpH 6.8において、10mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂の5CVで洗った。蛋白質を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、および27%のイソプロパノールで溶出させた。この画分を、pH 6.9において10mMのTris-HCl、10mMのリン酸ナトリウム、および5mMの

CaCl_2 により、3分の1希釈した。

【0054】

D. アニオン交換クロマトグラフィー

最終精製段階として、1mlのリソースQカラム(Pharmacia)を15°Cで適用した。このカラムを、pH 7.0において10mMのリン酸塩ナトリウムで平衡化した。ヒドロキシルアバタイトカラムからの溶出液を負荷し、続いて平衡緩衝液で2CV洗った。最後に、pH 7.0において10mMのリン酸塩ナトリウム、250mMのNaClで溶出することにより、結合したエリスロポエチンを、カラムに痕跡のDNAを残して遊離させた。蛋白質画分をultrafree-15 5k ultrafilter (Millipore)により10倍濃縮し、さらにpH 7.0において10mMのリン酸塩ナトリウムで2倍量に希釈した。

【0055】

得られたエリスロポエチン生成物の試料を、Coomassieで染色した SDS PAGE上で分析した。精製組換えヒトエリスロポエチン $70\mu\text{g}$ を負荷し、そして図3に示すように、生成物は宿主細胞由来の如何なる蛋白質をも実質的に含んでいなかつた。

本発明は好ましい実施態様に閑遠させて記述しているが、前記明細書を読めば当業者ならば多様なその変形、置き換えまたは均等物、並びに本書中に記載した方法の別の態様を実施できるであろう。

【図面の簡単な説明】

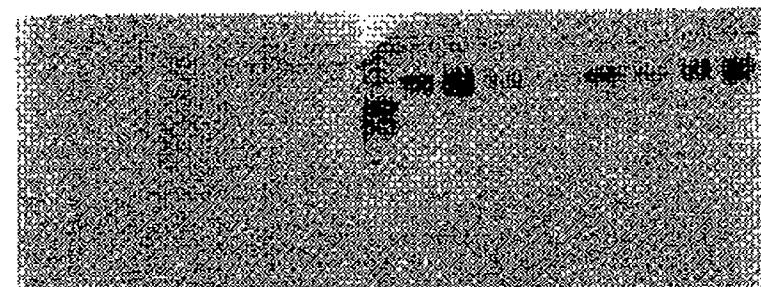
【図1】 図1は、8つの選択したBHK21 pMPSVgEPO、および8つの選択したCHO K1 : CycE pMPSVgEPO クローンの上澄みからのWestern Blot を示す。

【図2】 図2は、BHK21 pMPSVgEPO クローン2由來の細胞培養液上澄みの銀染色 SDSポリアクリルアミドゲルを示す。レーン1は濃縮していない上澄み液を示し、他方、レーン2は10倍濃縮上澄み液を示す。

【図3】 図3は、Coomassie 染色 SDS PAGE で分析した精製組換えヒトエリスロポエチンサンプルを示す。

【図1】

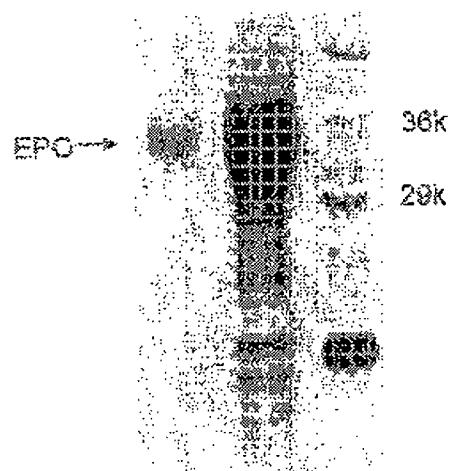
Fig. 1



クローン 1 2 3 4 5 6 7 8 M 1 2 3 5 6 7 8 10
CHO K1: CycE pMPSVgEPO BHK 21 pMPSVgEPO

【図2】

Fig. 2

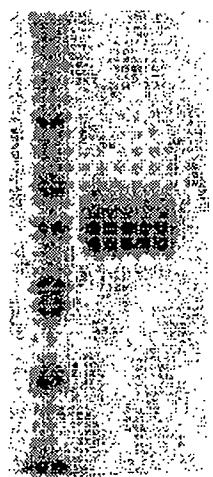


(23)

特表2002-524083

【図3】

Fig. 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 99/06486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/85 C07K14/505 C12N5/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
International classification searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K		
Document classes searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LIN J H ET AL: "Expression efficiency of the human thrombomodulin-encoding gene in various vector and host systems". GENE, NL, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, vol. 147, no. 2, page 287-292 XP002091316 ISSN: 0378-1119 abstract; table 2</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family numbers are listed in annex
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the International filing date "C" document which may throw doubt on priority, claim(s) or rights of the application or which affects the substance of another claim or other specific request (as specified) "D" document referring to oral disclosure, (e.g. exhibition or other event) "E" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report
7 February 2000		24/02/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 0218 Feudenheim 2 DE - 6900 FR Frankf. Tel. (+49-70) 940-2616, Tx. 91 021 epo 11, Fax. (+49-70) 940-2615		Authorized officer Harmon, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No.
PCT/EP 99/06465

C/Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication where appropriate of the relevant passages the whole document	Relevant to claim no.
Y	ARTELT P ET AL: "VECTORS FOR EFFICIENT EXPRESSION IN MAMMALIAN FIBROBLASTOID, MYELOID AND LYMPHOID CELLS VIA TRANSFECTION OR INFECTION" GENE, NL, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, vol. 69, no. 2 + INDEX, page 213-219 XP000000152 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-11
Y	ONODERA ET AL: "Development of improved adenosine deaminase retroviral vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 72, no. 3, page 1769-1774 XP002002909 ISSN: 0022-538X abstract; tables 1,2	1-11
Y	DATABASE MEDLINE 'Outline' /an 9611546A, 1995 RAUSCHENBACH R.: "Stable expression..." XP002001755 abstract	1-11
Y	VANDENDRIESSCHE M C T ET AL: "Development and analysis of retroviral vectors expressing human Factor-VIII and Factor-IX" BIOTECHNOLOGY, XX, XX, no. 236 Suppl. 16A. XP002001317 abstract	1-11
Y	ZANG M ET AL: "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING A PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM" BIO/TECHNOLOGY, US, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 13, page 389-392 XP002032677 ISSN: 0733-222X the whole document	1-11
Y	EP 0 653 487 A (MESSI FERRUGGIO DR) 17 May 1995 (1995-05-17) the whole document	5-11
Y	STOLL, T. S. ET AL: "Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production" J. BIOTECHNOL. (1996), 46(2), 111-23 , 1996, XP004036927 the whole document	5-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

SEARCHED Application No.
PCT/EP 99/06465

C(onsideration) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Description of document with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 148 605 A (KIRIN AMSEN INC) 17 July 1985 (1985-07-17) cited in the application example 10	1-11
A	WO 98 26084 A (RENNER WOLFGANG ANDREAS; BAILEY JAMES EDWIN (CH)) 18 June 1998 (1998-06-18) claims 13,15	1-11
A	EP 0 631 911 A (DOERR HANS WILHELM PROF DR MED) 17 March 1993 (1993-03-17) cited in the application table 2	1-11
A	(HARTMAN S C ET AL: "Two dominant-acting selectable markers for gene transfer studies in mammalian cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1988 NOV) 85 (21) 8047-51. , XP000872814	7-11
A	EGLITIS, H.A.: "Positive selectable markers for use with mammalian cells in culture." HUMAN GENE THERAPY, vol. 2, 1991, pages 195-201, XP000872273 page 196, column 2, line 5-30	7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Inventor Application No.
PCT/EP 99/06465

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0653487	A	17-05-1995	None		
EP 0148608	A	17-07-1985	US 4703008 A AT 54940 T AU 1007496 A AU 657655 B AU 2642192 A AU 3612597 A AU 600650 B AU 3746785 A AU 5272293 A AU 5780490 A AU 6981798 A CA 1339047 A CY 1643 A DK 365185 A ES 538519 A HK 20093 A IL 73785 A IL 96581 A IL 96582 A IL 104935 A JP 2708099 B JP 0269096 A JP 6093900 A JP 7076239 B JP 2957974 B JP 10095799 A JP 10072366 A JP 1055190 A JP 2107224 C JP 6055136 B JP 1975769 C JP 3198792 A JP 4035159 B JP 2655750 B JP 3259098 A JP 11253188 A JP 2017136 B JP 61501627 T MX 9203598 A NZ 210501 A NZ 227326 A NZ 227327 A SG 92891 G WD 8502610 A US 5956422 A US 5441368 A US 5765349 A US 5618698 A US 5621080 A US 5647933 A	27-10-1987 15-08-1990 06-04-1995 16-03-1995 08-10-1992 18-12-1997 23-08-1990 26-06-1985 24-03-1994 04-10-1990 20-08-1998 27-05-1997 14-05-1993 11-10-1995 01-05-1988 19-03-1993 15-11-1992 13-05-1993 04-04-1993 04-04-1993 04-02-1996 15-10-1996 08-04-1994 16-08-1995 06-10-1999 14-04-1998 17-03-1998 02-03-1989 06-11-1996 27-07-1994 27-09-1996 29-08-1991 10-06-1992 24-09-1997 19-11-1991 21-09-1999 19-04-1990 07-08-1986 01-09-1992 27-08-1991 27-08-1991 27-08-1991 14-02-1992 20-06-1985 21-09-1999 18-08-1995 26-05-1998 08-04-1997 15-04-1997 20-08-1996	
WO 9826094	A	18-06-1998	AU 7637796 A	03-07-1998	
EP 0531911	A	17-03-1993	EP 0531662 A AT 161040 T DE 59209058 B	17-03-1993 15-12-1997 22-01-1998	

Form PCT/ISA/810 (Search family 151-4) (May 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersEntered Application No
PCT/EP 99/06465

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0531911 A		ES 2111598 T 16-03-1998	
		GR 3026160 T 29-05-1998	
		JP 5252943 A 05-10-1993	
		US 5393668 A 28-02-1995	

Form PCT/ISA/20 (patent family entries) (July 1999)

フロントページの焼き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K
E, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E
A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ
, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA
, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, G
B, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL
, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, M
G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT
, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, V
N, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 CA04 DA02 EA04
FA02 FA10 GA11 HA01
4B064 AG18 CA19 CA19 CC03 CC24
CE10 DA01
4B065 AA9GX AB01 AC14 BA02
BB32 CA24 CA44

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年10月26日(2006.10.26)

【公表番号】特表2002-524083(P2002-524083A)

【公表日】平成14年8月6日(2002.8.6)

【出願番号】特願2000-569001(P2000-569001)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 P	21/02	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
C 12 R	1/91	(2006.01)

【F II】

C 12 N	15/00	A
C 12 P	21/02	C
C 12 N	5/00	B
C 12 P	21/02	C
C 12 R	1/91	

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月30日(2006.8.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒトエリスロポエチンの生産

【特許請求の範囲】

【請求項1】宿主細胞を適切な栄養条件で培養する段階を含む、哺乳動物宿主細胞中におけるヒトエリスロポエチンの生産方法であって、該宿主細胞が骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより制御されるヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされており、該栄養条件が血清を含まず蛋白質も含まない培地であることを含むものである方法。

【請求項2】DNA配列がゲノミッククローニングに由来するものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】宿主細胞が腎臓細胞である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】細胞がベビーハムスター腎臓細胞、好ましくはBHK21細胞である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】血清を含まず蛋白質も含まない培地がツルボドーマ(Turbodoma)培地である、請求項1ないし請求項4の何れかに記載の方法。

【請求項6】宿主細胞がそのトリプトファン産生能力により選択される、請求項1ないし請求項5の何れかに記載の方法。

【請求項7】宿主細胞が大腸菌のトリプトファンシンセターゼ(trpB)遺伝子の発現によりトリプトファンを生産し得る、請求項6に記載の方法。

【請求項8】さらに、宿主細胞の培養後、細胞培養培地からエリスロポエチンを回収する段階を含む、請求項1ないし請求項7の何れかに記載の方法。

【請求項9】骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより制御されるヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされ、血清を含まず蛋白質も含まない培地中で培養された哺乳動物宿主細胞。

【請求項10】 大腸菌のトリプトファンシンセターゼ(*trpB*)遺伝子の発現によりトリプトファンを生産し得る、請求項9に記載の哺乳動物宿主細胞。

【請求項11】 細胞が腎臓細胞、好ましくはベビーハムスター腎臓細胞、最も好ましくはBHK21細胞である、請求項9または請求項10に記載の哺乳動物宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターにより誘導されるヒトエリスロポエチン遺伝子を含有する発現ベクターにより形質転換された哺乳動物細胞、特に腎臓細胞中ににおける、組換え体ヒトエリスロポエチンの生産に関する。さらに本発明は、選択可能マークーとして大腸菌(*Escherichia coli*)由来のトリプトファンシンセターゼ遺伝子を用いるエリスロポエチン生産細胞の調製に関する。本発明はさらに、血清を含まず蛋白質も含まない培地を用いる細胞培養プロセスの改良にも向けられている。

【0002】

(発明の背景)

エリスロポエチンは、循環しているエリスロポエチン量の生理学的レベルを調節し維持する主要なホルモンであり、赤血球生成の早い段階で骨髄幹細胞の細胞分化を刺激し、最終的に赤血球になる分化細胞の増殖と成熟を促進する。エリスロポエチンは、34ないし38kDaの範囲の分子量を有し、その約40ないし50%が炭化水素部分とみられる糖蛋白質である。それは原始的には成人の腎臓内、および哺乳動物胎児の肝臓内に产生する。身体が健常状態にあり、組織が赤血球の現存数により充分に酸素供給を受けているときは、エリスロポエチンは血漿内に極めて低い濃度で存在している。この通常の低濃度は、通常の加齢によって失われてゆく赤血球の置換を刺激するには充分である。低酸素血症では循環する赤血球により輸送される酸素が減少し、循環系内のエリスロポエチン量が増加する。低酸素血症は、出血による大量の失血、放射線への過度の曝露による赤血球の破壊、高い高度あるいは人事不省による酸素取り込みの減少、または各種型の貧血により生じる。健康な生物ではホメオスタシス機構が、貧血の程度に応じて最適ヘマトクリット値を維持するように血中のエリスロポエチン濃度の増加を誘導する。

【0003】

しかしながら、慢性腎不全による貧血の場合は、進行性の腎実質および肝機能破壊のためエリスロポエチンが产生され得ず、従って、循環系中のエリスロポエチン濃度が増加しない。

エリスロポエチンは今や各種貧血症、特に慢性腎不全症の認容された処置として定着するに至っている。エリスロポエチンを含有する医薬製品は、さらに赤血球生成刺激による、腎機能低下のためあるいは腎摘出後のため血液透析を受けている患者の貧血予防および術後患者の回復促進などでも、臨床的に適用されている。

【0004】

組換え体ヒトエリスロポエチンは、哺乳動物細胞中で产生された最初の組換えバイオ医薬品として貧血症の処置のために入手可能となったものである。例えば、ドイツではC.H.O-K1セルライン中で产生された組換え体エリスロポエチンがJanssen-CilagからErypoの商品名(登録商標)で販売されている。

【0005】

ヒトエリスロポエチン遺伝子は、既に1985年に単離され、特性を調べられている(Lin et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7580-7584; Jacobs et al. (1985) Nature 313, 806-810)。この遺伝子の全コード化領域は5.4キロベースHindIII-BamHI断片内に含まれており、この遺伝子は4つのイントロン(1562塩基対)と5つのエクソン(582塩基対)とを含み、ヒトエリスロポエチン分泌のための27アミノ酸シグナルペプチド、および166アミノ酸の成熟蛋白質をコードしている。さらに、エリスロポエチンは、インビボでの活性に必要なシアル酸を含有している。非グリコシリ化(糖鎖付加のない)エリスロポエチンはインビトロの活性は有するが、インビボでは全く活性を示さない。これは

、非グリコシル化（糖鎖付加のない）蛋白質の半減期がヒトの循環系では極端に短いことによる。従って、治療に使用するためのエリスロポエチンは、天然ヒト糖タンパク質と類似のグリコシル化をもたらす哺乳動物細胞で製造しなければならない。

【0006】

Lin et al. (前記) は、SV40後期プロモーターにより誘導されるゲノミックエリスロポエチン遺伝子を含有する発現ベクターで安定的に形質転換した、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞中での組換え体ヒトエリスロポエチン産生を記載しており、他方、前記のJacobs et al.は、アデノウイルスの主要後期プロモーターの制御下にヒトエリスロポエチンcDNAを含有するベクターでトランスフェクトした、COS細胞（組み込まれたSV40DNAのセグメントを含有する癌細胞由来のセルライン）中の一過性発現実験でのエリスロポエチン産生を開示している。

【0007】

さらに、欧州特許出願No.0148605には、猿エリスロポエチンcDNAクローンおよびヒトゲノミッククローンの単離および性質特定、および、COS-1およびCHOセルライン中での組換え体エリスロポエチンの産生が記載されている（但し、猿およびヒトのエリスロポエチン遺伝子発現はSV40後期プロモーターの制御下で行う）。

【0008】

欧州特許出願No.0225231には、エリスロポエチン遺伝子をアデノウイルス-2主要後期プロモーター、またはマウスのMT-I (metallothionein-I) プロモーターのいずれかの制御下に発現させる、安定的にトランスフェクトした哺乳動物のセルライン中のエリスロポエチン産生プロセスが記載されている。

【0009】

さらに、欧州特許出願No.0232034には、ヒト細胞中の、即ち、ナマルワ(Namalwa)細胞中の、SV40プロモーターを用いてエリスロポエチンの発現を誘導し、ネオマイシン耐性(neo^r)遺伝子を選択可能なマーカーとして用いる、組換え体エリスロポエチンの産生が記載されている。

【0010】

同様に、欧州特許出願No.0236059には、M-MuLV (Moloney murine leukemia virus)LTRプロモーターの制御下で、neo^r遺伝子を選択可能なマーカーとする、ヒトエリスロポエチン遺伝子を保持する発現ベクターでトランスフェクトした、腎臓細胞中のエリスロポエチンの産生が開示されている。

しかしながら、大規模なエリスロポエチンの生産に適する効果的な発現システムがなお必要とされている。

【0011】

(発明の開示)

本発明の目的の一つは、従って、哺乳動物細胞中で高レベルにエリスロポエチンを発現させるエリスロポエチン発現ベクターを提供すること、および、該発現ベクターをベースとする組換え体エリスロポエチンの生産プロセスを提供することである。

【0012】

驚くべきことに、MPSV(骨髄増殖性肉腫ウイルス、myeloproliferative sarcoma virus)プロモーターおよびゲノミックエリスロポエチンDNA配列をベースとする新しい宿主ベクター系を用いると、哺乳動物細胞におけるエリスロポエチン生成物を、細胞培養液上澄み中の全蛋白質の50%以上にも及ぶ大画分となし得ることが判明した。

【0013】

本発明は、従って、MPSV(骨髄増殖性肉腫ウイルス)プロモーターにヒトエリスロポエチン遺伝子を作動可能なように連結させてある新規発現ベクターを提供するものである。さらに、該新規発現ベクターをトランスフェクトした哺乳動物宿主細胞を適切な栄養条件下に培養する段階を含む、哺乳動物宿主細胞中にエリスロポエチンを生産させるプロセスを提供するものである。

【0014】

骨髄増殖性肉腫ウイルスは、以前、Ostertag et al. (1980) *J. Virol.* 33, 573-582; よって報告され；ネズミの線維芽細胞 (murine fibroblasts) を形質転換し、さらに血液生成系の細胞中に変化を起こさせるものとして知られている。この本発明で用いるMPSVプロモーターは、既に、例えば、Arteit et al. (1988) *Gene* 68, 213-219によって研究されている。

【0015】

好ましい態様では、哺乳動物宿主細胞中でエリスロポエチンを生産させるこのプロセスは、(1) エリスロポエチンの発現がMPSVプロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターの調製、(2) 該エリスロポエチン発現ベクターの哺乳動物宿主細胞への導入、(3) 該細胞の培養によるエリスロポエチンの生産、および(4) 該細胞培地からのエリスロポエチンの回収、の各段階を含むものである。

好ましくは、哺乳動物宿主細胞は腎臓細胞であり、最も好ましくは、ベビーハムスターの腎臓 (BHK) 細胞、例えば、BHK 21 である。

【0016】

先行技術の多くは、DHFR 遺伝子によりコードされる酵素ジヒドロフォレートリダクターゼ (dihydrofolate reductase; DHFR) が、メトトレキセート (methotrexate) 薬剤によって阻害され得るという事実およびヒボキサンチンおよびチミジンを欠く培地中で増殖した細胞がメトトレキセートによって阻害または殺滅されるという事実に依拠する、DHFR 選択系を使用している。適当な条件下、例えばメトトレキセートの最小濃度においては、メトトレキセート含有培地中で耐性があり生育し得る細胞を取得することができる。これらの細胞は、それらのDHFR 遺伝子数が増幅すること、そのためDHFR 酵素産生の増加を来すことからメトトレキセート耐性であることが分る。

【0017】

これらの生存細胞は、順次メトトレキセートの濃度増加処理を受けてより多くのDHFR 遺伝子数を含有する細胞株となり得る。興味の対象である、DHFR 遺伝子と一緒に発現ベクター上に運び込まれた、またはDHFR 遺伝子と共に形質転換された遺伝子、例えば、エリスロポエチン遺伝子は、しばしばそれらの遺伝子コピー数を増加して見出される。従って、このDHFR 系は概して選択／増幅の組合せアプローチで用いられる。しかしながら、このDHFR 選択／増幅系の使用には、それに伴う若干の問題点がある。メトトレキセートの強い毒性のために、全生産プロセスを通して選択圧を維持することができない。高産生も、培地中からメトトレキセートを一旦除去すると、普通の生産性に戻ってしまうことが多い。

【0018】

さらに、先行技術でよく用いられている別の抗代謝物耐性マークー、neoマークーには、哺乳動物細胞中で形質転換体を選択するのに高価な薬剤であるG418を比較的に大量使用しなければならないという本質的な不都合がある。

従って、本発明の他の目的は、エリスロポエチン生産についての先行技術中で記載されている選択マーカーシステムの不都合を克服し、かつ有毒添加物を用いずに、哺乳動物細胞中でエリスロポエチンを大量生産させるプロセスを提供することにある。

【0019】

本発明によれば、トリプトファン生成能力に基づいて選択される哺乳動物宿主細胞中でエリスロポエチンを生産させるプロセスが提供される。

【0020】

多くの哺乳動物細胞は、ある種の、所謂必須アミノ酸合成に必要な酵素性経路を欠落しており、そのためそれらを外部ソースから得なければならぬ。必須アミノ酸 1 種の不存在だけでも蛋白質合成のはば 50% が阻害される；基礎的な速度は明かに内在性蛋白質の代謝回転によって維持される。1988年、Hartman and Mulligan (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8047-8051) は、形質転換した哺乳動物細胞の代謝性選択用マーカーとしてトリプトファンを適用できることを発見した。このマーカーシステムは、インドールのトリプトファンへの変換を触媒する大腸菌のトリプトファン合成遺伝子 (trpB) をベースとする

ものである。しかしながら、これまでのところ、*trpB*遺伝子がエリスロポエチン生産に有用な選択マーカーとして記載されたことは全くない。

【0021】

驚くべきことに、*trpB*を選択マーカーとして使用することにより、選択した宿主細胞中で、遺伝子増幅なしに高いエリスロポエチンの発現レベルを観測できることが判明した。

【0022】

好ましい態様では、トリプトファンシンセターゼ遺伝子を、エリスロポエチン発現ベクターと共に、宿主細胞にコトランスフェクトする。しかしながら、適切なプロモーター、好ましくはMPSVプロモーターの制御下のヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列と、やはり適切なプロモーターの制御下の*trpB*遺伝子とを含有する単一核酸分子で、哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトすることも勿論可能である。

【0023】

細胞培養培地に普通加えられている血清、例えば、牛胎児血清が、トリプトファンパックグラウンドを示すという事実があるため、血清は透析してトリプトファンを除去しておくべきである。それ故、この*trpB*選択システムは、トリプトファンを無毒かつ安価なインドールでより容易に置き換えること、血清を含まない培地中での大規模生産に特に有用である。

それ故、好ましい態様では、このエリスロポエチン大量生産プロセスは、外因性トリプトファンを欠く血清を含まない培地中で、哺乳動物宿主細胞を培養する段階を含む。好ましくは、この宿主細胞は腎臓細胞、好ましくはBHK細胞、例えば、BHK21である。

【0024】

上で言及したように、現今の生産プロセスは、例えば牛胎児血清を含有する培地中で生育する組換え体チャイニーズハムスター卵巣細胞のような組換え体哺乳動物細胞のローラーボトル培養をベースとするものである。血清の添加は、細胞増殖のために必要な増殖因子を供給するために必須である。この添加物の存在は、しかしながら、幾つかの観点から有害なものであり：主たる懸念は生成物の安全性である。製造プロセスから医薬製品を経由して患者に病原性因子を移送する危険については、特に狂牛病（BSE；bovine spongiform encephalopathy）が広範囲に蔓延したとき以来、格別の考慮が払われている。下流の工程の間に不活性化されないプリオン（prions）は、ウイルスと同様に、プロセスに際して重大な危険を与える。この心配があるために、この危険を最小化するために必要な安全性の基準は、原材料（血清）についてのおびただしい試験から最終製品の性状検査に至るまで、すさまじいものとなっている。

【0025】

製造プロセスにおいて全ての生物学的誘導材料を排除することが製品の品質および安全性を顕著に増加させるばかりでなく、同時に製造コストを低減し製品の承認も簡易化するので、血清を含まず蛋白質も含まない培地を使用することは、組換え体哺乳動物細胞の培養に少ながらぬ利点を与えるものである。

【0026】

例えば、EP-A-0148605は、0.1mM非必須アミノ酸およびL-グルタミンを補った高グルコースD MEM、または、0.05mM非必須アミノ酸およびL-グルタミンを補った、高グルコースD MEMとHam'sF12との50-50混合物である、血清を含まない生育培地中でのCHO細胞からのエリスロポエチンの製法を開示している。

さらに、欧州特許出願No.0513738には、動物インシュリンの代わりに原核細胞由来の組換え体インシュリンおよびトランスフェリン、並びに水溶性鉄化合物を含有する、血清を含まない培地中での哺乳動物細胞の培養が記載されている。

【0027】

EP-A-0531911は、ポリビニールフォルマルおよびポリビニールブチラル由來の培地表面を使用し、細胞が好ましくは遮蔽単層として培養された、蛋白質を含まない培地中でのvero細胞（vero cell）の培養プロセスを記載している。

しかしながら、多くの場合、血清を含まない培地中での培養は、その前に特別の適合ス

トラテジーにより血清を含まない培地中での生育に適合させたセルライン、例えば、Zang et al. (1995) により Bio/Technology 13, 389-392に記載されている適合させたCHO S S F 3 セルライン、または Sinacore et al. (1996) により Biotechnology and Bioengineering 52, 518-528に記載されているCHO D U K X 細胞系譜 (cell lineage) 、との関係においてのみ言及されている。

【0028】

BHK 21 細胞が、適合化または遺伝子操作しなくとも、血清を含まず蛋白質も含まない培地製剤である Turbodoma および Turbodoma HP-1 (Dr. F. Messi Cell Culture Technologies Bühnrain社、14, 8052 Zurich, Switzerland 製品) 中で生育することが見出された。この細胞は、10%の胎生性子牛血清と 2 mM の L-グルタミンを含有する Eagle's 最小必須培地から Turbodoma 培地中に移したのも、有意な生育力および生育速度の下降を伴わずに細胞増殖を継続した。しかも、この培地製剤で、BHK 21 細胞の培養は、懸濁液中でも担体に結合させてもいざれの場合も可能であった。従って、反応系およびプロセスパラメーターを多様に選択適用できる。

【0029】

本発明の好ましい態様では、本発明の血清を含まず蛋白質も含まない培地中で培養した、好ましくは BHK 21 セルラインである哺乳動物セルラインは、ヒトエリスロポエチンを生産する能力を有する。最も好ましくは、この血清を含まず蛋白質も含まない培地は、インドールを含有するが、しかし、トリプトファンは含有しないものとし、そのためトリプトファンシンセターゼ活性によりトリプトファンを產生し得るような細胞のみが生育し得るようにする。このトリプトファンシンセターゼ酵素活性は、細胞を、大腸菌由来の tr pB 遺伝子を保有する核酸分子でトランスフェクトすることにより具備するに至る。この tr pB 遺伝子は、任意のプロモーター、即ち、哺乳動物細胞中での転写をプロモートするプロモーター、例えば、ウイルス性プロモーター類例えばシミアンウイルス (simian virus) 40 (SV 40) の初期プロモーター、HIV および M P S V のプロモーター、などの制御下に置くことができる。

【0030】

それ故、好ましい態様では、本発明は、ヒトエリスロポエチンの生産プロセスであり、(1) エリスロポエチンの発現が M P S V プロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターの調製、(2) 該エリスロポエチン発現ベクターの BHK 21 細胞中への導入、(3) インドールは含有するがしかし外因性のトリプトファンは欠落している、蛋白質を含まず血清も含まない培地中での該細胞の培養、の各段階を含むものである。

【0031】

エリスロポエチンの発現が M P S V プロモーターの制御下にあるエリスロポエチン発現ベクターを使用し、この発現ベクターで形質転換した真核宿主細胞を、蛋白質を含まず血清も含まない培地中で培養することにより、EPO 発現レベルが、先行技術に記載されているプロモーター／エリスロポエチン融合構成物を使用する場合より際立って高くなることを見出した。同じことが、通常の培地との対比において、あるいは先行技術に記載されているような予め血清を含まない培地中で生育するように適合化させたセルラインとの対比において、蛋白質を含まず血清も含まない培地中で、M P S V／エリスロポエチン融合構成物で形質転換した真核細胞中にエリスロポエチンを产生させる場合にも当てはまる。

【0032】

本明細書中では、「エリスロポエチン」の用語は、エリスロポエチンの生物学的活性を有する：即ち、赤血球生成を刺激する能力がある、蛋白質を定義していることを意味する。この蛋白質は、ゲノミック DNA 配列により、または cDNA クローンによりコードされ得る。さらに、「エリスロポエチン」の用語は、天然に存在するエリスロポエチンの生物学的活性を有する蛋白質断片をも含んでいる。好ましくは、組換え体蛋白質は、アミノ酸配列および数（成熟蛋白質では 166 アミノ酸）、その約 40% ないし 50% が炭水化物部分に基づく約 34 ないし 38 kDa の分子量について、完全にまたは少なくとも実質的に、天然に存在するヒトエリスロポエチンと対応している。

【0033】

ヒトエリスロポエチンに対する遺伝子は、例えば、American Type Culture Collectionから、ATCC No.40381のラムダ HE 1 ファージ東結乾燥物として入手可能である。

【0034】

さらに、「プロモーター」の用語は、核酸分子中で遺伝子（ゲノミックまたはcDNAクローニング）に先行し、mRNAへの遺伝子の転写開始部位を提供しているDNA配列を定義していることを意味する。従って、「発現ベクター」の用語は、その中で、発現させようとしている遺伝子にプロモーターが作動可能なように連結しており、該ベクターを宿主細胞内に導入したのち、宿主細胞を該遺伝子によりコードされている蛋白質を産生し得るようにする、核酸分子を定義している。しかしながら、作動可能なようにプロモーター（特にMPSVプロモーター）に融合している有用な遺伝子（特にエリスロポエチン遺伝子）に加えて、発現ベクターはさらなるプロモーター配列または他の調節配列、例えば、エンハンサー配列例えばSV40、アデノウイルス、レトロウイルスのLTR、またはイムノグロブリン遺伝子、ボリアデニル化配列、または選択可能なマーカー配列を含有してもよい。適切な発現ベクターは、例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkによる標準マニュアルに記載されているような通常のクローニング技術を用いて取得できる。

【0035】

用語「宿主」は、非相同的の（異種起源の、heterologous）核酸分子で安定的に形質転換される、従って、そのゲノム中に該核酸分子または少なくともその部分を含有し、そして該核酸分子は該細胞により発現される、即ち転写および翻訳される遺伝子を保有しており、そして所望により遺伝子生成物が該細胞によって分泌される、細胞を含む。

【0036】

組換え体セルラインを確立するためには、種々の形質転換法を採用できる。好ましくは、これらの細胞は、リン酸カルシウム法でトランスフェクトする（実施例2に記載）。しかしながら、他の通常のトランスフェクション法、例えば、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション技術、リゾチーム融合、プロトプラス融合または赤血球融合、スクラッピング、直接取り込み、浸透性または蔗糖ショック、直接マイクロインジェクション、間接マイクロインジェクション、例えば赤血球媒介技術を介するもの、または宿主細胞への電流付加も使用できる。

【0037】

一般に、トランスフェクションまたは形質転換による、とは、単離したDNA、RNA、または組換え体DNA技術による合成スクレオチドポリマーを用いる、遺伝情報、特にcDNAまたはゲノミックエリスロポエチンクローニングによりコードされる情報の細胞中への移送を意味する。遺伝情報、特にヒトエリスロポエチンをコードするDNA配列情報の細胞中への移送は、選択可能マーカー、好ましくは大腸菌由來の選択可能マーカーであるトリプトファンシンセターゼ遺伝子との細胞のコトランスフェクションにより確認できる。

【0038】

哺乳動物細胞の培養には、通常の培養方法、例えば、通常の組織培養に使用されるフラスコまたは皿を用いる懸濁培養、紡錘型容器中で培地を攪拌して懸濁液中で細胞を生育させる方法、その中に培地を連続的に循環させる中空の纖維内で細胞を生育させる方法、および動物細胞の培養用のジャーファーメンター中で細胞を生育させる方法、などを適用できる。

【0039】

哺乳動物細胞の培養後、組換え体発現生成物を、培地から通常の精製技術、例えば、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー（ハイドロキシアパタイト）、ゲル濃過法、染料クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィー、を用いて実質的に精製形態で回収で

きる。

最終的に、回収したエリスロポエチンの生物学的活性は、数種の異なる方法により測定できる。Kurtz および Eckardt は、Nephron (1989);51 Suppl 1:11-14 中で最近のアッセイを総説している。

【0040】

(図面の簡単な説明)

図1は、8つの選択したBHK 21 pMPSVgEPO、および8つの選択したCHO K1 : Cyc E pMPSVgEPO クローンの上澄みからのWestern Blot を示す。

図2は、BHK 21 pMPSVgEPO クローン2由来の細胞培養液上澄みの銀染色 SDS ポリアクリルアミドゲルを示す。レーン1は濃縮していない上澄み液を示し、他方、レーン2は10倍濃縮上澄み液を示す。

図3は、Coomassie 染色 SDS PAGE で分析した精製組換え体エリスロポエチンサンプルを示す。

【0041】

本発明は、以下さらに詳しく例示的に説明する。

(実施例)

実施例1

エリスロポエチン発現ベクター pMPSVgEPO の調製

【0042】

American Type Culture Collectionから、ヒトエリスロポエチニン遺伝子を、凍結乾燥ラムダHE 1ファージ (Lin et al., 前記ATCC No.40381) として入手した。ヒトエリスロポエチニンのためのゲノミックDNAを含有する断片を保有するラムダファージを充分量、この凍結乾燥ファージをSM緩衝液 (Sambrook et al., 前記) 中に懸濁させ、そして該ファージを、0.3%グルコース、0.075mM CaCl₂、0.004mM FeCl₃、2mM MgSO₄ および1mg/mlマルトースを含有するLB寒天中でLE 392大腸菌細胞上にプレートすることにより調製した。このファージ粒子を、15cmペトリ皿当たり10mlのSMで一夜集めた。このライセート(Lysate)50mlのファージDNAを、Qiagen Lambda キットを用い、製造業者(Qiagen, Hilden, Germany)の指示どおりにして精製した。得られたDNAの50%を20μlH₂O中に取り込み、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびBamHI (New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Germany)各30ユニットで消化した。5.4 kb 断片を 0.8%アガロースゲルから、Bio 101 (Vista CA, USA)のGene Cleanキットを用いて溶出させた。この5.4 kb 断片は、4つの介在配列と5つのエクソンとを含む、ヒトエリスロポエチニン遺伝子の完全コードを含有していた (Lin et al., 前記参照)。

【0043】

MPSVプロモーターを保有するベクター pMPSVHE (Artelt et al., 前記)は、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびBamHIにより、製造業者(NEB)の指示どおりにして消化し、リニヤー化したベクターDNAを、Gene Cleanキット Bio 101を用いてゲル精製した。ベクターDNAほぼ0.5μgと精製エリスロポエチニン挿入遺伝子2μgを、T4 DNAリガーゼ(NEB)を用いてライゲートし、生成物をRbC1₂コンピテントDH5アルファ大腸菌細胞 (Sambrook et al., 前記) 中に形質転換した。制限分析により正確な挿入物を有するコロニーを同定し、Qiagen Midiprep キットによりプラスミドDNAを大量調製したのち、該ベクターを緩衝液2 (NEB)の存在下に制限酵素HindIIIおよびBstEII(NEB)で消化して、エリスロポエチニン遺伝子挿入の5'末端から575bp断片を除去した；エリスロポエチニン遺伝子挿入の制限マップについては前記Lin et al., を再参照)。粘着末端を、全4スクレオチドの存在下に37°Cで30分間、T7 DNAポリメラーゼ(NEB)で充填した。この充填反応生成物を、16°Cで30分間、T4 DNAリガーゼ(NEB)の存在下にライゲートし、次いでRbC1₂コンピテントDH5アルファ大腸菌細胞中に形質転換した。制限分析後、正しいベクターコンストラクトを有する大腸菌クローンを同定し、製造業者の指示どおりにQiagen Midiprep キットを用い、大量の当該ベクターDNAを調製した。生成したベクターは、MPSVプロモーターの制御下のゲノミックエリスロポエチニン遺伝子を保有

している、消化されたpMPSVgEPOであった。

【0044】

実施例2

pMPSVgEPOベクターによる、BHK21およびCHO-K1:cycE細胞の安定なトランスフェクション

大腸菌のトリプトファンシンセターゼ遺伝子(*trpB*)を、安定なpMPSVgEPOベクターの選択に使用した。この系では、トランスフェクトした細胞を、トリプトファンシンセターゼ遺伝子(*trpB*)の遺伝子生成物の酵素活性による、インドールを必須アミノ酸トリプトファンに変換する能力で選択する。

【0045】

CaPO₄トランスフェクションの前に、発現ベクターを制限酵素AattIIによりリニヤー化し、*trpB*選択プラスミドpSV2trpB（前記Hartman and Mulliganに記載）を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIでリニヤー化した。5.7μgのpMPSVgEPOと0.3μgのpSV2trpBとの混合物を、30μlのH₂O中に調製した。30μlの1M CaCl₂溶液を加えて混合した。60μlのリン酸塩溶液(50mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄、pH 7.05、滅菌濾過済み、オートクレーブ処理せず)を加えて5秒間ボルテックスした。室温で25秒間インキュベートした後、沈殿を胎児牛血清(FCS)2%を含むTurbodoma培地2mlを含むポリプロピレンのチューブに移した。

【0046】

6ウエルプレート中の、80%コンフルエントのBHK21およびCHO-K1:cycE細胞培養の培地(Renner et al. Biotech. Bioeng. 47, 476-482, 1995)を除去し、細胞を一度血清を含まないTurbodoma培地で洗った。沈殿を含む培地2mlを加えた後、細胞培養物を、37°C、5%CO₂で5時間インキュベートした。沈殿を除去し、グリセロール(Sigma)15%およびFCS2%を含有するTurbodoma培地を加えた。30秒後、グリセロールを含む培地を除去し、FCS10%を含有する培地5mlを加え、さらにプレートを数回ゆすった。培地を血清を含まない新鮮な培地3mlと置き換え、18時間後、細胞を、トリプトファンの代わりに300μMのインドールと5%の透析した胎児牛血清(Life Technologie)を含有する50mlの選択培地を満たしたペトリ皿中に移した。最初のクローンは、10日間培養した後視認できるようになるので、培養物を0.8%アガロースで積層してから拾った。1.6%アガロース溶液をMgおよびCaを含まないPBS中に調製し、オートクレーブし、そして42°Cまで冷ました。この溶液を1:1比で予め加温した培地(42°C)と混合し、この溶液30mlでプレートを積層した。室温でゲル化させたのち、コロニーをピペットで拾った。残りの細胞培養プラスチックに粘着した細胞をトリプシンで脱着した。

【0047】

最初のクローンを、24ウエルプレート内の次いでT25フラスコ内の、血清を含まないTurbodoma培地で生育させた。8つの選択したBHK21およびCHO-K1:cycE細胞クローンの生産性を、Western Blot分析で測定した。Western Blot分析では、全BHK21細胞クローン中の生産性は、CHO-K1:cycE細胞の場合よりも多くとも10倍高かった(図1参照)。全BHK21クローンは、組換え体エリスロポエチンをかなりの量で生産した。

最良結果を生成した2種(クローン2および10)を、異なった細胞培養系中懸滴およびマイクロキャリヤー内で試験した。実施例3および4に詳述する。

【0048】

実施例3

懸滴培養での組換え体ヒトエリスロポエチンの生産

BHK21-pMPSVgEPO、クローン2を、スピナーフラスコ(Integra Bioscience)内の血清を含まず蛋白質も含まないTurbodoma培地で懸滴して生育させた。T-25フラスコ内で生育した2000万個の細胞を細胞解離液(Sigma)で脱着し、さらにスピナーフラスコ内で0.5g/lPuluronic F68(Sigma)を補ったTurbodoma培地200ml中に接種した。培養条件は、37°C、5%CO₂、回転数20 rpmであった。100,000細胞/mlの密度から出

発し、細胞を4日間でほぼ100万細胞/mlの密度になるまで生育させた。7日後、細胞培養物を集め、培養液を3分間250gで遠心分離した。上澄みをSDS PAGEで分析し、分子量約34-38kD(図2)のところに強いバンドを検出した。Western Blot分析により、このバンドが抗エリスロポエチン抗体(Research Diagnostics, USA)と交差反応性であることを確認した。図2で観察できるように、生成物は上澄み中の総蛋白質の約50%を占めている。

【0049】

実施例4

マイクロキャリヤー培養での組換え体ヒトエリスロポエチンの生産

BHK21-pMPSVgEPO、クローン2を、スピナーフラスコ(Integra Bioscience)内の、血清を含まず蛋白質も含まないTurbodoma HP-1培地(F. Messi Cell Culture Technologies)中でマイクロキャリヤーに付着させて生育させた。T-フラスコ内で生育した2000万個の細胞を細胞解離溶液(Sigma)で脱着し、さらにTurbodoma HP-1培地25ml中で、5%CO₂の存在下、37℃で5時間の間に、0.6gのCytodex 1マイクロキャリヤー(Pharmacia)に接種した。このマイクロキャリヤーは、製造業者の指示どおりに調製した。0.5g/1Puluronic F68(Sigma)を補ったTurbodoma HP-1培地200mlを入れたスピナーフラスコ内に、培養物を移した。培養条件を、37℃、5%CO₂、回転数20 rpmとした。100,000細胞/mlの密度から出発し、4日間で細胞が集合体となるまで生育させた。4日後、マイクロキャリヤーを沈殿させ、培地の70%を新鮮培地で置き換えた。5日後および6日後、それぞれ、培地の40%を新鮮培地で置き換え、7日後細胞培養物を集めた。上澄みは、ELISA(EPO ELISA, Boehringer Mannheim)で測定すると、10mg/l濃度の組換え体ヒトエリスロポエチンを含有していた。この組換え体エリスロポエチン生成物を、実施例5に記載したようにして精製した。

【0050】

実施例5

組換え体ヒトエリスロポエチンの精製

この実施例は、細胞培養物上澄み液からの組換え体ヒトEPOの精製に関する。このプロセスは、下記各段階を含み：

- A. 青色セファロース上の染料クロマトグラフィー、
- B. プチルートヨバール(Toyopearl)上の疎水性相互作用クロマトグラフィー、
- C. ヒドロキシルアバタイト上のクロマトグラフィー、
- D. リソースQ上のアニオン交換クロマトグラフィー、

Laemmli, U.K.に従うSDS-PAGEで分析し、Coomassieまたは銀染色したとき、約34,000MWのポリペプチド成分と示される。

【0051】

A. 染料クロマトグラフィー

細胞を含まない培養物上澄みのpHを、酢酸でpH5.0に調節し、4℃ないし10℃で0.45μmフィルターを通してロ過した。ロ液、この実施例では200ml、を、予めpH5.0、4ml/mlin、10℃で、20mMの酢酸ナトリウム、5mMのCaCl₂および100mMのNaClとで平衡化した、5mlの青色セファロースCL-6B(Pharmacia)カラム上に適用した。このゲルを、pH5.0において20mMの酢酸ナトリウム、5mMのCaCl₂および250mMのNaClの5CVで、pH6.5において20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂の5CVで洗った。蛋白質は、pH9.0で、100mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、および1MのNaClの2CVで溶出した。

【0052】

B. 疎水性相互作用クロマトグラフィー

青色セファロースカラムからの溶出液を、クロマトグラフィーの直後に1N HClでpH6.9とし、負荷する前に10%イソプロパノールとした。5mlカラムにブチルートヨバール(TosoHaas)を室温で負荷し、pH6.9で、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、10%のイソプロパノールで平衡化した。蛋白質試料を負荷させたのち、カラムを、pH6.9において、20mMのTris-HCl、5mMのCaCl₂、750mMのNaCl、19%のイソプロパノールで洗った

EPO含量が優勢な蛋白質を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5 mMのCaCl₂、750mMのNaCl、27%のイソプロパノールで溶出させた。この画分を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5 mMのCaCl₂により、3分の1希釈した。

【0053】

C. ヒドロキシルアバタイト上のクロマトグラフィー

カラム5 mlにヒドロキシルアバタイトUltraGelを室温で負荷し、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5 mMのCaCl₂、250mMのNaCl、9%のイソプロパノールで平衡化した。前段階からの希釈溶出液を負荷後、カラムをpH 6.8において、10mMのTris-HCl、5 mMのCaCl₂の5 CVで洗った。蛋白質を、pH 6.9で、20mMのTris-HCl、5 mMのCaCl₂、750mMのNaCl、および27%のイソプロパノールで溶出させた。この画分を、pH 6.9において10mMのTris-HCl、10mMのリン酸ナトリウム、および5 mMのCaCl₂により、3分の1希釈した。

【0054】

D. アニオン交換クロマトグラフィー

最終精製段階として、1 mlのリソースQカラム(Pharmacia)を15°Cで適用した。このカラムを、pH 7.0において10mMのリン酸ナトリウムで平衡化した。ヒドロキシルアバタイトカラムからの溶出液を負荷し、続いて平衡緩衝液の2 CVで洗った。最後に、pH 7.0において10mMのリン酸ナトリウム、250mMのNaClで溶出することにより、結合したエリスロポエチンを、カラムに痕跡のDNAを残して遊離させた。蛋白質画分をultrafree-15 5k ultrafilter (Millipore)により10倍濃縮し、さらにpH 7.0において10mMのリン酸ナトリウムで2倍量に希釈した。

【0055】

得られたエリスロポエチン生成物の試料を、Coomassieで染色したSDS PAGE上で分析した。精製組換え体ヒトエリスロポエチン70 μgを負荷し、そして図3に示すように、生成物は宿主細胞由来の如何なる蛋白質をも実質的に含んでいなかった。

本発明は好ましい実施態様に閑遠させて記述しているが、前記明細書を読めば当業者ならば多様なその変形、置き換えまたは均等物、並びに本書中に記載した方法の別の態様を実施できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、8つの選択したBHK21pMPSVgEPO、および8つの選択したCHO K1:CycEpMPSVgEPOクローンの上澄みからのWestern Blotを示す。

【図2】 図2は、BHK21pMPSVgEPOクローン2由來の細胞培養液上澄みの銀染色 SDSポリアクリラミドゲルを示す。レーン1は濃縮していない上澄み液を示し、他方、レーン2は10倍濃縮上澄み液を示す。

【図3】 図3は、Coomassie 染色SDS-PAGEで分析した精製組換え体エリスロポエチンサンプルを示す。